

WOB 99 AD CNR ANGI

①9 RÉPUBLIQUE FRANÇAISE  
INSTITUT NATIONAL  
DE LA PROPRIÉTÉ INDUSTRIELLE  
PARIS

①1 N° de publication : 2 796 073

(à n'utiliser que pour les  
commandes de reproduction)

②1 N° d'enregistrement national : 99 08779

⑤1 Int Cl<sup>7</sup> : C 07 K 16/42, C 12 P 21/08, G 01 N 33/53, A 61 K 39/  
395, A 61 P 9/00

①2

## DEMANDE DE BREVET D'INVENTION

A1

②2 Date de dépôt : 07.07.99.

③0 Priorité :

⑦1 Demandeur(s) : CENTRE NATIONAL DE LA  
RECHERCHE SCIENTIFIQUE CNRS Etablissement  
public à caractère scientifique et technologique — FR.

④3 Date de mise à la disposition du public de la  
demande : 12.01.01 Bulletin 01/02.

⑤6 Liste des documents cités dans le rapport de  
recherche préliminaire : *Se reporter à la fin du  
présent fascicule*

⑥0 Références à d'autres documents nationaux  
apparentés :

⑦2 Inventeur(s) : PLOUET JEAN, JOUANNEAU  
JACQUELINE, THIERY JEAN PAUL, SAVAGNER  
PIERRE, MALAUD BERNARD ANDRE et SOR-  
DELLO SYLVIE.

⑦3 Titulaire(s) :

⑦4 Mandataire(s) : GROSSET FOURNIER ET DEMA-  
CHY SARL.

⑤4 ANTICORPS ANTI-IDIOTYPIQUES DES FACTEURS DE CROISSANCE DES FIBROBLASTES ET LEUR  
UTILISATION COMME MEDICAMENTS.

⑤7 La présente invention a pour objet l'utilisation d'anti-  
corps anti-idiotypiques du facteur de croissance fibroblasti-  
que 1 et/ ou d'anticorps anti-idiotypiques du facteur de  
croissance fibroblastique 2, pour la préparation d'un médi-  
cament destiné au traitement de pathologies impliquant des  
cellules endothéliales engagées dans un processus d'an-  
giogénèse, soit pour inhiber l'angiogénèse, soit pour favori-  
ser l'angiogénèse, sans affecter les cellules endothéliales  
quiescentes, ou pour la préparation d'un produit de diagnos-  
tic de pathologies impliquant des cellules endothéliales en-  
gagées dans un processus d'angiogénèse.

BEST AVAILABLE



## ANTICORPS ANTI-IDIOTYPIQUES DES FACTEURS DE CROISSANCE DES FIBROBLASTES ET LEUR UTILISATION COMME MEDICAMENTS.

L'invention a pour objet des anticorps anti-idiotypiques des facteurs de croissance des fibroblastes et leur utilisation comme médicaments.

Les facteurs de croissance des fibroblastes, ou facteurs de croissance fibroblastiques (FGFs, « fibroblast growth factors ») sont actuellement reconnus comme les acteurs majeurs de l'homéostasie cellulaire. Le rôle des FGFs a été démontré dans l'angiogénèse, la tumorigénèse et les dégénérescences neuronales.

La diminution des FGFs provoque l'apoptose (mort programmée de la cellule), et leur surabondance provoque la multiplication cellulaire.

Les facteurs de croissance des fibroblastes sont une famille de peptides de 16-30 kDa se liant à l'héparine. Des exemples des membres de la famille des FGFs sont : facteur de croissance des fibroblastes acides aFGF (« acidic fibroblast growth factor »)/FGF-1 (Jaye *et al.*, Science 233 : 541, 1986), facteur de croissance des fibroblastes basiques bFGF (« basic fibroblast growth factor »)/FGF-2 (Abraham *et al.*, Science 233 : 545, 1986), int-2/FGF-3 (Smith *et al.*, EMBO J. 7 : 1013, 1988), FGF-4 (Delli-Bovi *et al.*, Cell 50 : 729, 1987), FGF-5 (Zhan *et al.*, Mol. Cell Biol. 8 : 3487, 1988), FGF-6 (Marics *et al.*, Oncogene 4 : 335, 1989) ; FGF-7 (Finch *et al.*, Science 245 : 752, 1989), FGF-8 (Tanaka *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89 : 8928, 1992) et FGF-9 (Miyamoto *et al.*, Mol. Cell Biol. 13 : 4251, 1993).

La demande de brevet WO 90/05184 (CHIRON) décrit des compositions contenant des FGFs humains basiques et acides, qui sont acétylés en position amino-terminale. Les demandes WO 96/35708 et WO 96/35716 (HOPKINS UNIVERSITY OF MEDICINE) décrivent respectivement des homologues des facteurs de croissance des fibroblastes 1 et 2.

A ce jour, au moins 18 gènes codant pour des peptides de cette famille ont été identifiés. Quatre gènes différents codent pour des tyrosine kinases transmembranaires identifiées comme des récepteurs des FGFs, appelés FGF-R 1 à 4. Chacun de ces gènes peut générer plusieurs isoformes par épissage optionnel de l'ARN pré-messager. La structure de ces gènes est conservée, c'est-à-dire que leur domaine extracellulaire est constitué de 2 ou 3 domaines de type immunoglobuline et d'un domaine intracellulaire doué d'activité tyrosine kinase. Ainsi, l'isoforme de FGF-R1 comportant les 3 domaines de type immunoglobuline (FGF-R1/3 boucles) lie le FGF2 et non le FGF1, alors que

l'isoforme FGF-R1/2 boucles lie avec la même affinité FGF1 et FGF2. Par ailleurs, l'utilisation de l'exon IIIb confère au FGF-R2 (FGF-R2b) la compétence à lier le FGF1 sans lier FGF2, alors que l'utilisation de l'exon IIIc lui confère la compétence à lier FGF1 et FGF2 (Revue Bikfalvi A. Klein S., Pintucci G., Rifkin DM., Endocrine reviews, 1997, 18, 26-45).

Or un facteur de croissance peut induire de nombreux effets différents par exemple la prolifération ou la survie, selon qu'il se lie à l'un ou à l'autre de ses récepteurs. L'immunoneutralisation peut donc avoir des effets bénéfiques en inhibant la prolifération, mais aussi des effets indésirables en diminuant la survie.

L'analyse des fonctions *in vivo* résultant de l'activation de l'un quelconque des récepteurs de facteurs de croissance se liant à l'héparine, tels que les FGFs, se heurte à deux écueils majeurs.

D'une part, la combinaison des interactions entre ligands (tels que les FGFs) et récepteurs est fort complexe, car un facteur de croissance peut se lier à plusieurs récepteurs et de même, plusieurs facteurs de croissance peuvent se lier à un même récepteur. Ainsi, les produits des 18 gènes codant pour les FGFs disposent des produits des 4 gènes codant pour des récepteurs des FGFs.

D'autre part, leur forte affinité pour les glycosaminoglycanes fait que les facteurs de croissance tels que FGF sont séquestrés dans les matrices extracellulaire et ne sont retrouvés qu'au voisinage immédiat de leur lieu de synthèse, ce qui rend difficile l'appréhension de leur rôle *in vivo*.

A ce jour, il n'existe pas d'autres ligands que les FGFs pour chacune des isoformes des récepteurs des FGFs. Etant donné leur séquestration dans les matrices extracellulaires, l'utilisation des FGFs ne permet pas de distinguer *in vivo* la fonction de chacune de ces isoformes, et donc leur rôle réel en physiopathologie.

L'un des buts de l'invention est de proposer l'utilisation d'anticorps anti-idiotypiques de facteurs de croissance à affinité pour l'héparine, permettant de cibler spécifiquement sur l'un ou l'autre de leurs récepteurs, un nouveau type d'agonistes circulants.

L'un des autres aspects de l'invention est de fournir des antagonistes de récepteurs de facteurs de croissance ayant une spécificité appropriée et une longue durée de demi-vie.

L'un des autres buts de l'invention est de fournir des images internes des domaines de liaison des FGFs à leurs récepteurs, qui du fait de leur structure immunoglobulinique sont circulants.

Plus particulièrement, l'un des buts de l'invention est de fournir des images internes des domaines de liaison du FGF1 à FGF-R2b, et du FGF2 à FGF-R1, qui du fait de leur structure immunoglobulinique sont circulants.

L'un des autres buts de l'invention est de proposer l'utilisation d'anticorps anti-idiotypiques pour stimuler ou inhiber l'activité des récepteurs du FGF1 et/ou des récepteurs du FGF2, ou de proposer des vecteurs de médicaments d'intérêt par l'intermédiaire des récepteurs du FGF1 et/ou du FGF2.

La présente invention concerne l'utilisation d'anticorps anti-idiotypiques du facteur de croissance fibroblastique 1 et/ou d'anticorps anti-idiotypiques du facteur de croissance fibroblastique 2, pour la préparation d'un médicament destiné au traitement de pathologies impliquant des cellules endothéliales engagées dans un processus d'angiogénèse, soit pour inhiber l'angiogénèse, soit pour favoriser l'angiogénèse, sans affecter les cellules endothéliales quiescentes, ou pour la préparation d'un produit de diagnostic de pathologies impliquant des cellules endothéliales engagées dans un processus d'angiogénèse.

L'expression "cellules endothéliales engagées dans un processus d'angiogénèse" signifie cellules endothéliales migrant à travers la lame basale et se multipliant.

Pour déterminer si des cellules sont engagées dans un processus d'angiogénèse, on peut avoir recours à l'immunomarquage à l'aide d'anticorps dirigés contre l'intégrine  $\beta 3$  (Brooks et al., Cell, 1994, 79 : 1157-1164) ou le VEGF-R2 (Ortega N. et al., American Journal of Pathology, Vol. 151, 1215-1224, 1997).

L'expression "cellules endothéliales quiescentes" signifie cellules endothéliales des vaisseaux adultes normaux, non angiogéniques.

L'invention concerne l'utilisation d'anticorps anti-idiotypiques du facteur de croissance fibroblastique 1 et/ou d'anticorps anti-idiotypiques du facteur de croissance fibroblastique 2, pour la préparation d'un médicament destiné au traitement de pathologies impliquant les cellules endothéliales angiogéniques, par stimulation sélective respective du récepteur FGFR2b et FGF-R1.

L'expression « cellules endothéliales angiogéniques » désigne les cellules impliquées dans un processus d'angiogénèse.

Selon un mode de réalisation avantageux, l'invention concerne l'utilisation d'anticorps anti-idiotypiques du facteur de croissance fibroblastique 1 et/ou d'anticorps anti-idiotypiques du facteur de croissance fibroblastique 2, pour la préparation d'un médicament destiné au traitement de pathologies impliquant des cellules endothéliales engagées dans un processus d'angiogénèse, pour inhiber l'angiogénèse, sans affecter les cellules endothéliales quiescentes, lequel anticorps anti-idiotypique est couplé à une toxine dont la fonction est de bloquer la traduction des protéines, ladite toxine étant notamment choisie parmi la saporine, la ricine ou bien un élément radioactif tel que l'iode 125 ou 131, ou lequel anticorps anti-idiotypique est sous forme de fragment Fab.

Selon un autre mode de réalisation avantageux, l'invention concerne l'utilisation d'anticorps anti-idiotypiques du facteur de croissance fibroblastique 1 et/ou d'anticorps anti-idiotypiques du facteur de croissance fibroblastique 2, pour la préparation d'un médicament destiné au traitement de pathologies impliquant des cellules endothéliales engagées dans un processus d'angiogénèse pour favoriser l'angiogénèse, sans affecter les cellules endothéliales quiescentes.

Ainsi, on pourra notamment citer, selon l'invention, l'utilisation d'anticorps anti-idiotypiques du facteur de croissance fibroblastique 1 ou d'anticorps anti-idiotypiques du facteur de croissance fibroblastique 2 pour la préparation d'un médicament destiné à :

- favoriser l'angiogénèse physiologique pour augmenter la vitesse de la formation des vaisseaux sanguins au cours de la cicatrisation, de la maturation du corps jaune de l'ovaire, et/ou

- favoriser l'angiogénèse au cours de pathologies obstructives des vaisseaux afin de reperfuser des territoires ischémiés lors de thrombose vasculaire comme notamment dans l'artérite des membres inférieurs et l'infarctus du myocarde, et/ou

- stimuler sélectivement l'activité des récepteurs du FGF1 et/ou du FGF2 dans des pathologies où lesdits récepteurs sont fonctionnellement déficients, et/ou

- inhiber sélectivement l'activité des récepteurs du FGF1 et/ou du FGF2 à l'aide de fragments Fab ou d'anticorps anti-idiotypiques bloquants, et/ou

- retarder ou arrêter le processus de dégénérescence des photorécepteurs de la neuroretine observé au cours des rétinites pigmentaires génétiques ou acquises lors des surdosages de médicaments inhibant la phosphodiesterase dépendant du GMP-cyclique, et/ou

- stimuler la phagocytose des segments externes des bâtonnets par les cellules épithéliales pigmentées de la rétine comme traitement de certaines rétinopathies pigmentaires et des formes sèches de la dégénérescence maculaire liée à l'âge.

De même, on pourra citer, selon l'invention, l'utilisation d'anticorps anti-idiotypiques du facteur de croissance fibroblastique 1 et/ou d'anticorps anti-idiotypiques du facteur de croissance fibroblastique 2, associés à une toxine ou de fragment Fab d'anticorps anti-idiotypique, pour la préparation d'un médicament destiné au traitement de pathologies nécessitant l'inhibition de l'angiogénèse telles que cancer, rétinopathies diabétiques et le rejet de greffes de cornée.

Selon un mode de réalisation avantageux, l'invention concerne un anticorps anti-idiotypique, notamment monoclonal, et notamment humanisé, du facteur de croissance fibroblastique 1, caractérisé en ce qu'il est respectivement un ligand du récepteur humain FGFR2b.

Plus particulièrement, l'invention concerne un anticorps anti-idiotypique, notamment monoclonal, et notamment humanisé, du facteur de croissance fibroblastique 1, caractérisé en ce qu'il présente les propriétés suivantes :

- il est spécifique vis-à-vis du récepteur FGF-R2b,
- il est circulant,
- il présente une durée de demi-vie d'environ 23 jours, notamment d'environ 21 jours, et en particulier de 22,5 jours,
- il induit la phosphorylation sur une tyrosine d'une protéine de 140 kDa,
- il induit la prolifération des cellules endothéliales vasculaires,
- il stimule l'angiogénèse,
- il ne provoque pas d'hypotension artérielle.

Selon un autre mode de réalisation avantageux, l'invention concerne un anticorps anti-idiotypique, notamment monoclonal, et notamment humanisé, du facteur de croissance fibroblastique 2, caractérisé en ce qu'il est respectivement un ligand du récepteur humain FGF-R1.

Plus particulièrement, l'invention concerne un anticorps anti-idiotypiques du facteur de croissance fibroblastique 2, notamment monoclonal, et notamment humanisé, caractérisé en ce qu'il présente les propriétés suivantes :

- il est spécifique vis-à-vis du récepteur FGF-R1,
- il est circulant,

- il présente une durée de demi-vie d'environ 23 jours, notamment d'environ 21 jours, et en particulier de 22,5 jours,
- il induit la phosphorylation sur une tyrosine d'une protéine de 140 kDa,
- il induit la prolifération des cellules endothéliales vasculaires,
- 5 - il stimule l'angiogénèse,
- il ne provoque pas d'hypotension artérielle.

Les anticorps anti-idiotypiques du FGF1 de l'invention reconnaissent le récepteur humain FGF-R2b, mais ne reconnaissent pas le récepteur FGF-R1.

10 Les anticorps anti-idiotypes du FGF2 de l'invention reconnaissent le récepteur humain FGF-R1 mais ne reconnaissent pas le récepteur FGF-R2b.

L'expression « anticorps anti-idiotypique du facteur de croissance fibroblastique 1, caractérisé en ce qu'il est spécifique vis-à-vis du récepteur FGF-R2b », signifie qu'il active les fonctions de FGF-R2b.

15 De même, l'expression « anticorps anti-idiotypique du facteur de croissance fibroblastique 2, caractérisé en ce qu'il est spécifique vis-à-vis du récepteur FGF-R1 », signifie qu'il active les fonctions de FGF-R1.

20 La spécificité des anticorps anti-idiotypiques de FGF1 vis-à-vis de FGF-R2b peut être déterminée selon le test de compétition avec le FGF1 radioiodé vis-à-vis de sa liaison à des cellules CHO transfectées avec des vecteurs d'expression eucaryote contenant la séquence du récepteur FGF-R2b.

De même, la spécificité des anticorps anti-idiotypiques de FGF2 vis-à-vis de FGF-R1 peut être déterminée selon le test de compétition avec le FGF2 radioiodé vis-à-vis de sa liaison à des cellules CHO transfectées avec des vecteurs d'expression contenant la séquence du récepteur FGF-R1.

25 L'expression « anticorps anti-idiotypique circulant » signifie véhiculé librement dans le sang circulant et non capté par les parois vasculaires.

A la différence des anticorps anti-idiotypiques FGF1 et FGF2 de l'invention, les facteurs de croissance FGF1 et FGF2 ne sont pas circulants.

30 L'intérêt de ce que les anticorps anti-idiotypiques de l'invention soient spécifiques et circulants, est de cibler sur les cellules endothéliales angiogéniques des drogues qui n'affectent pas les cellules endothéliales quiescentes.

S'agissant de la durée de demi-vie des anticorps anti-idiotypiques, elle est variable d'une espèce à l'autre.

La durée de demi-vie des anticorps anti-idiotypiques FGF1 ou FGF2 de l'invention, peut être mesurée selon le test suivant : injection intraveineuse du ligand (FGF1 ou FGF2) radioiodé, puis recueil à différents intervalles de temps de sang et comptage de la radioactivité. La durée de demi-vie correspond au temps nécessaire pour que 50% de la radioactivité initiale ait disparu du sang circulant.

La durée de demi-vie du FGF1 est inférieure à 2 minutes ; la durée de demi-vie du FGF2 est inférieure à 2 minutes. A titre indicatif, la durée de demi-vie des IgG est de l'ordre de 23 jours.

La protéine de 140 kDa sur laquelle les anticorps anti-idiotypiques du FGF1 de l'invention induisent la phosphorylation d'une tyrosine est FGF-R2b.

La protéine de 140 kDa sur laquelle les anticorps anti-idiotypiques du FGF2 de l'invention induisent la phosphorylation d'une tyrosine est FGF-R1.

Cet aspect signifie que l'activation de FGF-R2b par les anticorps anti-idiotypiques FGF1, peut déclencher des fonctions, telles que la prolifération, la migration, la résistance à l'apoptose, nécessitant la phosphorylation de FGF-R2b.

De même, l'activation de FGF-R1 par les anticorps anti-idiotypiques FGF2, peut déclencher des fonctions telles que la prolifération, la migration, la résistance à l'apoptose, nécessitant la phosphorylation de FGF-R1.

Cet aspect peut être mesuré par le test de phosphorylation, destiné à vérifier que les anticorps anti-idiotypiques selon l'invention sont fonctionnels, c'est-à-dire qu'ils induisent la phosphorylation au niveau de résidus tyrosine des récepteurs de FGF, faute de quoi il ne peut y avoir de fonctions biologiques telles que la prolifération, la dissociation, l'angiogénèse etc...

Une méthode conventionnelle de mesure de l'activité de phosphorylation du récepteur FGF, par exemple FGF-R1, consiste dans un premier temps, à incuber pendant 24 heures des cellules VSM en milieu sans sérum, puis pendant 10 minutes en présence ou en l'absence de 100 ng/ml de FGF2 ou FGF1, ou 500 µg/ml de Ig2Id F1 ou Ig2Id F2. Les cellules sont ensuite rincées avec une solution de tampon phosphate (PBS) froid puis lysées, et le FGF-R1 est immunoprécipité à l'aide d'un anticorps anti FGF-R1. Le complexe est séparé par électrophorèse sur gel de dodécyle sulfate de sodium (SDS), transféré sur une membrane de nitrocellulose, et la phosphorylation de FGF-R1 est révélée à l'aide d'un anticorps anti-phosphotyrosine.



L'induction de la prolifération des cellules endothéliales vasculaires signifie qu'elles se multiplient. Ceci peut être déterminé selon le test décrit ci-après (voir exemples, paragraphe 3.1 « Mitogénicité »).

La stimulation de l'angiogénèse signifie que la liaison des anticorps anti-idiotypiques FGF1 au récepteur FGF-R2b suivie de la phosphorylation sur une tyrosine de FGF-R2b et de la prolifération cellulaire suffisent à déclencher l'angiogénèse.

De même, la stimulation de l'angiogénèse signifie que la liaison des anticorps anti-idiotypiques FGF2 au récepteur FGF-R1 suivie de la phosphorylation sur une tyrosine de FGF-R1 et de la prolifération cellulaire suffisent à déclencher l'angiogénèse.

Ceci peut être quantifié par le test décrit ci-après (voir exemples, paragraphe 3.3 « Angiogénèse cornéenne »).

L'invention concerne également le fragment Fab des anticorps anti-idiotypiques FGF1 et/ou FGF2 selon l'invention.

L'invention concerne également le complexe entre un anticorps anti-idiotypique selon l'invention (à savoir un anticorps anti-idiotypique du facteur de croissance fibroblastique FGF1 et/ou du facteur de croissance fibroblastique FGF2), et une toxine, en particulier choisie parmi la saporine, la ricine, ou bien un élément radioactif tel que l'iode 125 ou 131, ou le strontium.

L'invention a également pour objet un procédé de préparation d'un anticorps anti-idiotypique du facteur de croissance fibroblastique 1 et/ou d'un anticorps anti-idiotypique du facteur de croissance fibroblastique 2 selon l'invention, caractérisé en ce que:

a) on injecte le facteur de croissance fibroblastique 1 (FGF1) et/ou le facteur de croissance fibroblastique 2 (FGF2) purifié chez un animal, notamment un lapin,

b) on prélève le sang pour récupérer les immunoglobulines (Ig) purifiées contenant des anticorps anti-FGF1 (Ig1 F1) et/ou anti-FGF2 (Ig1 F2) spécifiques, par exemple par chromatographie d'affinité pour la protéine A puis, on purifie éventuellement les Ig1 F1 et/ou Ig1 F2 spécifiques à partir des Ig purifiées, par exemple par chromatographie d'affinité pour le FGF1 et/ou FGF2,

c) on injecte les susdites Ig purifiées ou les susdites Ig1 F1 et/ou Ig1 F2 spécifiques et purifiées chez l'animal de la même espèce que celui utilisé lors de l'injection de FGF1 et/ou FGF2, notamment dans les ganglions poplités de lapin de même allotype que celui qui a produit Ig1 F1 et/ou Ig2 F2, lors de l'injection de FGF1 et/ou FGF2,

d) on prélève le sang pour récupérer les Ig totales, par exemple par la protéine A, puis pour soumettre les Ig totales à deux immunoadsorptions :

- une immunoadsorption sur une colonne d'affinité préparée avec les Ig préimmunes du lapin (Ig PI) qui a servi à faire les Ig1 F1 et/ou Ig1 F2, pour éliminer les anticorps anti-allotypes ou isotypes,

- une immunoadsorption sur une colonne d'affinité préparée avec des Ig1 F1 et/ou des Ig1 F2, pour purifier les anticorps anti-idiotypiques (Ig2Id F1 ou Ig2Id F2).

L'étape a) d'injection du FGF1 ou du FGF2 chez un animal, notamment un lapin, a lieu sous la peau.

L'expression « anticorps anti-FGF1 (Ig1 F1) spécifiques » signifie que les anticorps dirigés contre le FGF1 (anticorps anti-FGF1) ne reconnaissent pas le FGF2 : en effet, on observe moins de 5% de réaction croisée avec FGF2, ce qui signifie qu'il faut au moins 20 fois plus de FGF2 que de FGF1 pour neutraliser la même quantité d'anticorps anti-FGF1. De même que pour les anticorps anti-FGF1 spécifiques, les anticorps anti-FGF2 (Ig1 F2) spécifiques ne reconnaissent pas le FGF1 : en effet, on observe moins de 5% de réaction croisée avec FGF1.

L'invention a également pour objet un anticorps anti-idiotypique du facteur de croissance fibroblastique 1 et/ou du facteur de croissance fibroblastique 2, susceptible d'être obtenu selon le procédé suivant :

a) on injecte le facteur de croissance fibroblastique 1 (FGF1) et/ou le facteur de croissance fibroblastique 2 (FGF2) purifié chez un animal, notamment un lapin,

b) on prélève le sang pour récupérer les immunoglobulines (Ig) purifiées contenant des anticorps anti-FGF1 (Ig1 F1) et/ou anti-FGF2 (Ig1 F2) spécifiques, par exemple par chromatographie d'affinité pour la protéine A puis, on purifie éventuellement les Ig1 F1 et/ou Ig1 F2 spécifiques à partir des Ig purifiées, par exemple par chromatographie d'affinité pour le FGF1 et/ou FGF2,

c) on injecte les susdites Ig purifiées ou les susdites Ig1 F1 et/ou Ig1 F2 spécifiques et purifiées chez l'animal de la même espèce que celui utilisé lors de l'injection de FGF1 et/ou FGF2, notamment dans les ganglions poplités de lapin de même allotype que celui qui a produit Ig1 F1 et/ou Ig2 F2, lors de l'injection de FGF1 et/ou FGF2,

d) on prélève le sang pour récupérer les Ig totales, par exemple par la protéine A, puis pour soumettre les Ig totales à deux immunoadsorptions :

- une immunoadsorption sur une colonne d'affinité préparée avec les Ig préimmunes du lapin (Ig PI) qui a servi à faire les Ig1 F1 et/ou Ig1 F2, pour éliminer les anticorps anti-allotypes ou isotypes,

- une immunoadsorption sur une colonne d'affinité préparée avec des Ig1 F1 et/ou des Ig1 F2, pour purifier les anticorps anti-idiotypiques (Ig2Id F1 ou Ig2Id F2).

L'invention a également pour objet un procédé de préparation d'un anticorps monoclonal anti-idiotypique de FGF1 et/ou d'un anticorps monoclonal anti-idiotypique de FGF2 selon l'invention, caractérisé en ce que :

- a) on injecte FGF1 et/ou FGF2 à un animal, et notamment à une souris,
- b) on récupère les splénocytes de l'animal synthétisant des Ig1 F1 et/ou Ig1 F2,
- c) on fusionne les susdits splénocytes avec des cellules de myélome,
- d) on sélectionne les hybridomes obtenus à l'issue de l'étape c) précédente en ce qu'ils synthétisent des immunoglobulines dirigées contre FGF1 et/ou FGF2,
- e) on injecte les Ig1 F1 et/ou Ig1 F2 ainsi sélectionnés à l'issue de l'étape d) à un animal, et notamment à une souris, de même allotype que celui ayant produit Ig1 F1 et/ou Ig1 F2,
- f) on récupère les splénocytes synthétisant des Ig2Id F1 et/ou Ig2Id F2,
- g) on fusionne les cellules de la rate (splénocytes) avec des cellules de myélome,
- h) on sélectionne les hybridomes obtenus à l'issue de l'étape g) précédente en ce qu'ils synthétisent des Ig2Id F1 dirigés contre Ig1 F1 et/ou des Ig2Id F2 dirigés contre Ig1 F2,
- i) on récupère lesdits Ig2Id F1 et/ou des Ig2Id F2.

Selon un mode de réalisation avantageux du procédé de préparation décrit ci-dessus, d'un anticorps monoclonal anti-idiotypique de FGF1 et/ou d'un anticorps monoclonal anti-idiotypique de FGF2, les modalités de l'étape a) consistent à injecter à une souris, dans un premier temps, 3 fois par voie sous cutanée à 15 jours d'intervalle, puis une quatrième fois par voie intrapéritonéale ou intraveineuse, le facteur de croissance fibroblastique 1 et/ou le facteur de croissance fibroblastique 2, en une quantité variant de 5 à 50 µg de FGF1 et/ou FGF2.

Après l'étape a) d'injection, on prélève la rate de la souris pour récupérer les splénocytes synthétisant des Ig1F1 et/ou des Ig1 F2. Lors du prélèvement de la rate, on fusionne les splénocytes totaux avec des cellules du myélome. Les cellules hybrides en résultant se multiplient et l'on trie ensuite celles qui sécrètent l'anticorps d'intérêt. Les splénocytes non fusionnés meurent en 8 jours.

L'étape i) de récupération des anticorps anti-idiotypiques selon l'invention consiste plus particulièrement à :

- sélectionner les anticorps anti-idiotypiques FGF1 par leur capacité d'inhiber la liaison de FGF1 iodé au récepteur FGF-R2b et de pas inhiber la liaison de FGF1 iodé au récepteur FGF-R1,

- sélectionner les anticorps anti-idiotypiques FGF2 par leur capacité d'inhiber la liaison de FGF2 iodé au récepteur FGF-R1 et de pas inhiber la liaison de FGF2 iodé au récepteur FGF-R2b.

Pour préparer les fragments Fab des anticorps anti-idiotypiques FGF1 et/ou FGF2 de l'invention, on peut procéder tel que décrit dans le manuel intitulé « Antibodies, a laboratory manual, 628-629, Harlow and David Lane Editeurs, Cold Spring Harbor Laboratory, 1998 ».

L'invention est également relative à des compositions pharmaceutiques caractérisées en ce qu'elles comprennent à titre de substance active au moins un anticorps anti-idiotypique FGF1 et/ou FGF2 selon l'invention, ou au moins le fragment Fab selon l'invention ou au moins le complexe selon l'invention, en association avec un véhicule pharmaceutiquement acceptable.

Les abréviations utilisées ci-dessus, ainsi que dans les exemples et les figures ci-dessous ont les significations suivantes :

**PBS** : phosphate buffer saline.

**Ig** : immunoglobulines

**IgG** : immunoglobulines G

**Ig PI** : immunoglobulines de lapin purifiées par protéine A-sepharose à partir de sang prélevé avant l'immunisation par FGF1 et/ou FGF2.

**Ig1 F1** : immunoglobulines de lapin 1 purifiées par protéine A-sepharose à partir de sang prélevé après immunisation par le FGF1, (anticorps dirigés contre FGF1).

**Ig1 F2** : immunoglobulines de lapin 1 purifiées par protéine A-sepharose à partir de sang prélevé après immunisation par le FGF2, (anticorps dirigés contre FGF2).

**Ig2Id F1** : immunoglobulines de lapin 2 purifiées par protéine A-sepharose à partir de sang prélevé après l'immunisation par le Ig1 F1, (anticorps anti-idiotypiques de FGF1).

**Ig2Id F2** : immunoglobulines de lapin 2 purifiées par protéine A-sepharose à partir de sang prélevé après l'immunisation par le Ig1 F2 (anticorps anti-idiotypiques de FGF2).

**FGF-Rs** : récepteurs des FGF, par exemple FGF-R1 et FGF-R2b.

Selon un mode de réalisation avantageux, l'invention concerne l'utilisation d'anticorps anti-idiotypiques de FGF1 pour :

- stimuler l'activité des récepteurs du FGF1,
- 5 - inhiber l'activité des récepteurs du FGF1 par des anticorps bloquants ou des fragments Fab,
- coupler Ig2Id F1 à des médicaments ou gènes d'intérêt afin de les vectoriser sur des cellules exprimant les récepteurs du FGF1 et stimuler l'activité de ces récepteurs,
- coupler Ig2Id F1 à des médicaments, toxines ou gènes d'intérêt afin de les
- 10 vectoriser sur des cellules exprimant les récepteurs du FGF1 et les détruire,
- coupler Ig2Id F1 à des traceurs radioactifs afin de les vectoriser sur des cellules exprimant les récepteurs du FGF1 et les visualiser dans tout système d'imagerie médicale.

Selon un autre mode de réalisation avantageux, l'invention concerne l'utilisation d'anticorps anti-idiotypiques de FGF2 pour :

- stimuler l'activité des récepteurs du FGF2,
- inhiber l'activité des récepteurs du FGF2 par des anticorps bloquants ou des
- 15 fragments Fab,
- coupler Ig2Id F2 à des médicaments ou gènes d'intérêt afin de les vectoriser sur des cellules exprimant les récepteurs du FGF2 et stimuler l'activité de ces récepteurs,
- 20 - coupler Ig2Id F2 à des médicaments, toxines ou gènes d'intérêt afin de les vectoriser sur des cellules exprimant les récepteurs du FGF2 et les détruire,
- coupler Ig2Id F2 à des traceurs radioactifs afin de les vectoriser sur des cellules exprimant les récepteurs du FGF2 et les visualiser dans tout système d'imagerie
- 25 médicale.

## DESCRIPTION DES FIGURES

Les **Figures 1A** et **1B** représentent la spécificité des anticorps anti-idiotypiques Ig2Id F1 et Ig2Id F2 pour les récepteurs FGF-Rs.

Plus particulièrement, la figure 1A représente la spécificité des anticorps anti-idiotypiques Ig2Id F1 et Ig2Id F2 pour le récepteur FGF-R1/2 boucles, et la figure 1B représente la spécificité des anticorps anti-idiotypiques Ig2Id F1 et Ig2Id F2 pour le récepteur FGF-R1/3 boucles.

L'axe des abscisses des figures 1A et 1B représente la concentration de modulateurs, à savoir la concentration de FGF1, FGF2, Ig2Id F1 et Ig2Id F2, exprimée en nM.

L'axe des ordonnées de la figure 1A représente la liaison de FGF2 iodé sur FGF-R1/2 boucles (exprimée en %) et, celui de la figure 1B représente la liaison de FGF2 iodé sur FGF-R1/3 boucles (exprimée en %).

Des cellules CHO pgsA-745 transfectées avec FGF-R1/2boucles ou FGF-R1/3 boucles sont inoculées avec les concentrations désirées de FGF1, FGF2, Ig2Id F1 et Ig2Id F2, et 2 ng/ml de FGF2 radioiodé pendant 3 h à 4°C. Les puits sont ensuite rincés, le tapis cellulaire est ensuite lysé avec NaOH 0.2 M comme décrit ci-dessous.

Dans la figure 1A ainsi que dans la figure 1B, la courbe comportant le losange noir ( ♦ ) correspond à FGF2, la courbe comportant le triangle noir ( ▲ ) correspond à Ig2Id F1, et la courbe comportant le carré noir ( ■ ) correspond à Ig2Id F2.

La Figure 2 représente la prolifération des cellules musculaires lisses d'aorte (VSM), et plus particulièrement, l'action proliférative des anticorps anti-idiotypiques Ig2Id F1 et Ig2Id F2 sur lesdites cellules.

L'axe des abscisses de la figure 2 représente la concentration de modulateurs, à savoir la concentration de FGF1, FGF2, Ig2Id F1 et Ig2Id F2 ; la concentration de FGF1, FGF2, Ig2Id F1 et Ig2Id F2 étant exprimée en nM.

L'axe des ordonnées de la figure 2 représente le nombre de cellules VSM par puits ( $\times 10^{-3}$ ).

La courbe comportant le losange noir ( ♦ ) correspond à FGF2, la courbe comportant le carré noir ( ■ ) correspond à Ig2Id F1, et la courbe comportant le triangle noir ( ▲ ) correspond à Ig2Id F2.

Les cellules VSM sontensemencées à faible densité (5000 cellules/puits) dans des boîtes de 24 puits. Des doses variables de FGF2, Ig2Id F1 ou Ig2Id F2 sont ajoutées après adhésion des cellules au plastique de culture. Chaque condition est étudiée dans deux puits différents. Les cellules sont trypsinisées et comptées au quatrième jour.

La **Figure 3** représente l'inhibition de l'action mitogénique des Ig2Id (anticorps anti-idiotypiques FGF1 et/ou FGF2) par les anticorps Ig1 F1 et Ig1 F2 sur les cellules VSM.

Les histogrammes gris (voir celui du côté gauche) correspondent à l'absence d'anticorps, les histogrammes hachurés (voir celui du milieu) correspondent à la présence d'anticorps anti-FGF2 (Ig1 F2) et, les histogrammes noirs avec des points blancs (voir celui de droite) correspondent à la présence d'anticorps anti-FGF1 (Ig1 F1).

L'axe des abscisses représente respectivement, de gauche à droite : la mise en présence du contrôle ou des Ig1 F1 ou des Ig1 F2 respectivement avec le contrôle, avec FGF2, avec Ig2Id F2, avec FGF1, avec Ig2Id F1.

L'axe des ordonnées de la figure 3 représente le nombre de cellules VSM par puits ( $\times 10^{-3}$ ).

Les cellules VSM sontensemencées à faible densité (5000 cellules/puits) dans des boîtes de 24 puits. 5 ng/ml de FGF1 ou FGF2 ou, 20  $\mu$ g/ml de Ig2Id F1 ou Ig2Id F2 sont ajoutées après l'adhésion des cellules au plastique de culture en présence ou absence de 50  $\mu$ g/ml de Ig1 F1 ou Ig1 F2. Chaque condition est étudiée dans deux puits différents. Les cellules sont trypsinisées et comptées au quatrième jour.

Les **Figures 4A** et **4B** représentent respectivement la prolifération des cellules NBT-II et NBT-II/R1, et plus particulièrement, l'action proliférative des anticorps anti-idiotypiques Ig2Id F1 et Ig2Id F2 sur lesdites cellules.

L'axe des abscisses des figures 4A et 4B représente la concentration de modulateurs, à savoir la concentration de FGF1, FGF2, Ig2Id F1 et Ig2Id F2, exprimée en ng/ml.

L'axe des ordonnées des figures 4A et 4B représente le nombre de cellules par puits ( $\times 10^{-3}$ ).

La courbe comportant le losange noir (  $\blacklozenge$  ) dans les figures 4A et 4B correspond à FGF1, et courbe comportant le carré noir (  $\blacksquare$  ) dans les figures 4A et 4B correspond à Ig2Id F1.

La courbe comportant le triangle noir (  $\blacktriangle$  ) de la figure 4B correspond à FGF2, et la courbe comportant la croix de la figure 4B correspond à Ig2Id F2.

Les cellules NBT-II ou NBT-II/R1 sontensemencées à 5000 cellules/puits dans des boîtes de 24 puits. Des doses variables de FGF1, FGF2, Ig2Id F1 ou Ig2Id F2 sont

ajoutées après adhésion des cellules au plastique de culture. Chaque condition est étudiée dans deux puits différents. Les cellules sont trypsinisées et comptées au quatrième jour.

5 La **Figure 5** représente la dissociation des cellules NBT-II et NBT-II/R1.

Les cellules NBT-II ou NBT-II/FGF-R1 sontensemencées à faible densité dans des plaques de 12 puits (5000 cellules par puits). Le lendemain les modulateurs, à savoir FGF1, FGF2, Ig2Id F1 et Ig2Id F2 sont ajoutés au milieu et, au quatrième jour les cellules sont observées et photographiées au microscope inversé à contraste de phase  
10 NIKON diaphot.

La **Figure 6** représente l'angiogénèse cornéenne.

Les rectangles gris (à gauche) correspondent au score d'angiogénèse au jour J7, et les rectangles hachurés (à droite) correspondent au score d'angiogénèse au jour J14.

15 L'axe des abscisses représente respectivement, de gauche à droite, le contrôle, FGF2, Ig2Id F1, Ig2Id F2.

L'axe des ordonnées représente le score d'angiogénèse.

Une incision de 3 mm de long, intéressant la moitié de l'épaisseur cornéenne, est réalisée au dôme cornéen, sous microscope opératoire. Le stroma cornéen est clivé, en directions diamétralement opposées, jusqu'à 2 mm du limbe. Les implants, préalablement réhydratés par 2 µl de PBS contenant 30 µg de Ig2Id F1 et Ig2Id F2. Après 14 jours, la néovascularisation est quantifiée. Chaque modulateur a été étudié dans au moins 4 globes oculaires de 4 lapins distincts (8 lenticules). Les différences de score d'angiogénèse entre chaque condition et les lenticules contrôles sont évaluées par  
20 le test du t de Student.

Les **Figures 7A et 7B** représentent respectivement la croissance tumorale des cellules NBT-II et NBT-II/R1 chez la souris nude.

L'axe des abscisses des figures 7A et 7B représente le nombre de jours après l'implantation chez la souris nude, et l'axe des ordonnées représente le volume tumoral (en mm<sup>3</sup>).  
30

La courbe comportant le carré noir ( ■ ) correspond à Ig2Id F2, la courbe comportant le triangle noir ( ▲ ) correspond à Ig2Id F1, et celle comportant le losange noir ( ◆ ) correspond au contrôle.



3,5 millions de cellules NBT-II ou NBT-II/R1 sont injectés sous la peau du flanc droit de 2 groupes de 30 souris nude femelles âgées de 6 semaines. 4 jours plus tard, chacun des 2 groupes précédents est divisé en 3 groupes de 10 souris par tirage au sort et les dimensions des éventuelles tumeurs sont mesurées à l'aide d'un pied à coulisse. 500 µg de Ig2Id F1 ou de Ig2Id F2 dilués dans un volume final de 100 µl de tampon phosphate + gélatine (2mg/ml) sont injectés par voie intraveineuse au niveau des veines de la queue. Cette injection est répétée tous les 3 jours pendant 50 jours. Les mesures sont réalisées aux mêmes intervalles par un opérateur ignorant le traitement reçu par chaque groupe de souris dans chacun des 6 groupes.

## **METHODES D'ETUDE**

### **EXEMPLE :**

#### **1. Fabrication d'anticorps anti-idiotypiques de FGF1 et FGF2**

##### **1-1 Fabrication d'anticorps préimmuns (Ig PI).**

Avant chaque immunisation, du sang est prélevé, le sérum est fractionné immédiatement après le recueil et 15 ml de sérum sont chromatographiés sur une colonne de protéine A (0,9 x 18 cm). La colonne est lavée par du PBS et les immunoglobulines sont éluées par de la glycine 0,2 M tamponnée à pH 2,5, immédiatement neutralisées par adjonction de 1/5 du volume de K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 1 M, puis dialysées contre du PBS. Les immunoglobulines (Ig PI) sont conservées à - 80 °C jusqu'à leur utilisation.

##### **1-2 Fabrication d'anticorps anti-FGF1 (Ig F1) et anti-FGF2 (Ig F2).**

100 µg de FGF1 sont émulsionnés dans 0.25 ml d'adjuvant de Freund complet puis injectés chez un lapin, 4 fois à 15 jours d'intervalle. Le sang prélevé entre 3 et 7 mois après la première injection est fractionné et les Ig sont purifiées par chromatographie d'affinité pour la protéine A (Ig1 F1). Ces anticorps neutralisent l'activité du FGF1 sans inhiber celle du FGF2.

Selon le même protocole il a été fabriqué des anticorps neutralisants anti-FGF2 (Ig1 F2) qui ne neutralisent pas l'activité du FGF1.

### 1-3 Fabrication d'anticorps anti-idiotypiques de FGF1 (Ig2Id F1) et de FGF2 (Ig2Id F2).

Les animaux sont prémédiqués, et 1 ml d'une solution de Bleu Evans est injectée dans la plante des pattes arrières ; 15 minutes plus tard les lapins sont anesthésiés. Les creux poplités sont rasés et désinfectés à la Bétadine. Une incision horizontale de 2 cm, centrée sur le creux poplité est faite aux ciseaux, puis les espaces cellulaires sont dilacérés. De un à trois ganglions de 2 mm de diamètre sont repérés grâce à leur coloration bleue et 10 µg d'Ig1 F1 mélangé volume à volume avec de l'adjuvant complet de Freund y est injecté à l'aide d'une micro-seringue de Hamilton sous un volume final de 100 µl et une quantité d'anticorps primaire de 20 µg. La technique est répétée au niveau de l'autre patte.

De quatre à cinq rappels toutes les trois semaines sont effectués de manière percutanée en utilisant une émulsion volume à volume de l'immunogène (Ig1F1 ou Ig1F2) et d'adjuvant incomplet de Freund. Les prélèvements sanguins de 40 ml sont réalisés toutes les trois semaines du 4<sup>ème</sup> mois au 9<sup>ème</sup> mois.

Le sang prélevé entre 4 et 7 mois après la première injection est purifié comme décrit précédemment. Les Ig anti-idiotypes (Ig2Id F1) sont alors purifiées par chromatographie d'affinité pour la protéine A.

Selon le même protocole il a été injecté des Ig1 F2 qui ont donné lieu à la formation d'anticorps anti-idiotypiques du FGF2 (Ig2 F2).

Le tri et/ou la purification des anticorps anti-idiotypiques selon l'invention est effectué tel que décrit précédemment, en soumettant les Ig totales à deux immunoadsorptions (voir étape d) décrite précédemment dans le procédé de préparation des anticorps anti-idiotypiques).

### 2. Etude de la spécificité des anticorps anti-idiotypiques selon l'invention.

Des cellules CHO pgsA 745 natives ou transfectées par FGF-R1/2 boucles ou FGF-R1/3 boucles ensemencées à 30 000 cellules par puits de 2 cm<sup>2</sup> sont cultivées en milieu DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) contenant 10% de sérum de veau foetal, 100 UI/ml de pénicilline et 50 µg/ml de streptomycine.

La liaison de FGF2 radioiodé (1.10<sup>5</sup> à 2.10<sup>5</sup> cpm/ng) aux cellules transfectées est mesurée à 4 °C. Les cellules sont lavées 2 fois avec du tampon de liaison (DMEM contenant 20 mM Hepes (Acide N-2-hydroxyéthylpipérazine-N'-2-éthane sulfonique) et

2 mg/ml de gélatine ajustée à un pH de 7,4). 2 ng/ml de FGF2 iodé sont ajoutés avec des concentrations variables de FGF1 ou de FGF2 non marqué ou d'Ig2Id F1 ou Ig2Id F2 sous un volume final de 0.5 ml.

La liaison non spécifique est déterminée en présence d'un excès (500 ng) de FGF2 purifié. Les liaisons totales et non spécifiques sont déterminées en double. Après deux heures, les cellules sont lavées 3 fois avec du tampon froid et lysées avec 0.5 ml de NaOH 0.2 M. L'iode 125 contenu dans le matériel solubilisé est compté dans un compteur gamma.

### 3. Activités biologiques des anticorps anti-idiotypiques selon l'invention

#### 3.1 Mitogénicité

Les cellules musculaires lisses d'aorte (VSM) sontensemencées à faible densité (5000 cellules/puits) dans des boîtes de 24 puits. Les modulateurs FGF1, FGF2, Ig2Id F1 et Ig2Id F2, sont ajoutés après adhésion des cellules au plastique de culture, et après 2 jours. Chaque condition est étudiée dans deux puits différents. Les cellules sont trypsinisées et comptées au quatrième jour.

Ig2Id F1 et IG2Id F2 déclenchent un effet mitogène sur les cellules VSM.

#### 3.2 Différenciation cellulaire

Les cellules NBT-II ou NBT-II/FGF-R1 sontensemencées à faible densité dans des plaques de 12 puits (5000 cellules par puits). Le lendemain, FGF1, FGF2, Ig2Id F1 et Ig2Id F2 sont ajoutés au milieu, et au quatrième jour les cellules sont observées et photographiées au microscope inversé à contraste de phase NIKON diaphot.

#### 3.3 Angiogénèse cornéenne

Les lapins prémédiqués sont anesthésiés. L'œil est extériorisé et immobilisé à l'aide d'une membrane de latex, porteuse en son centre d'une fente de 1 cm de long. Une incision de 3 mm de long, intéressant la moitié de l'épaisseur du stroma cornéen est réalisée au dôme cornéen, sous microscope opératoire (microscope OPMI, Zeiss). Le stroma cornéen est clivé, en directions diamétralement opposées, jusqu'à 2 mm du limbe. Les implants préalablement réhydratés par 20 µl de la solution à tester sont insérés (FGF2 200 ng, Anticorps anti-idiotypiques ou anticorps contrôles 40 µg).

L'apparition de néovaisseaux, naissant de la vascularisation limbique est étudiée en simple aveugle (sans connaissance du numéro du lapin, correspondant à la substance étudiée) après 7 et 14 jours sous anesthésie générale, et quantifiée en fonction d'une échelle à 5 niveaux ou score d'angiogénèse.

- 5           Score 0 = absence de néovaisseaux,  
            Score 1 = néovaisseaux n'atteignant pas la demi distance séparant l'implant du limbe,  
            Score 2 = néovaisseaux atteignant la demi distance,  
            Score 3 = néovaisseaux dépassant la demi distance mais n'envahissant pas  
10          l'implant,  
            Score 4 = atteinte et envahissement de l'implant par les néovaisseaux.

Les lapins sont ensuite sacrifiés et les globes oculaires prélevés et fixés dans du liquide de Bouin, aux fins d'analyses histologiques.

- 15          Chaque modulateur (FGF1, FGF2, Ig2Id F1 et Ig2Id F2) a été étudié dans au moins 4 globes oculaires de 4 lapins distincts (8 lenticules). Les différences de score d'angiogénèse entre chacune des conditions testées et les lenticules contrôles sont évaluées par le test du t de Student.

### 3.4 Croissance tumorale

20

#### Croissance chez la souris nude de la lignée de carcinome vésical

- 25          Les cellules NBT-II et NBT-II/FGF-R1 sont décollées des plastiques de culture à l'aide de trypsine-EDTA, homogénéisées, centrifugées et mises en suspension dans du milieu de culture additionné de 10% de sérum de veau foetal. 1ml correspondant à 3,5 millions de cellules, est injecté sous la peau du flanc droit de chaque souris. La viabilité de la suspension est vérifiée au préalable par coloration vitale au bleu trypan ; le colorant est exclu de plus de 99% des cellules. 2 groupes de 30 souris nude femelles âgées de 6 semaines ont été implantées avec des cellules NBT-II ou NBT-II/FGF-R1.

- 30          4 jours plus tard, chacun des 2 groupes précédents est divisé en 3 groupes de 10 souris par tirage au sort. Les dimensions des éventuelles tumeurs sont mesurées à l'aide d'un pied à coulisse électronique et, les modulateurs (FGF1, FGF2, Ig2Id F1 et Ig2Id F2) dans un volume final de 100 µl de tampon phosphate + gélatine (2mg/ml), sont injectés par voie intraveineuse au niveau des veines de la queue (Anticorps anti-idiotypiques FGF1 et FGF2 : 500 µg, Anticorps non-immuns : 500 µg / injection).

Les injections sont répétées deux fois par semaine, les mesures sont réalisées aux mêmes intervalles par un opérateur ignorant le traitement reçu par chaque groupe de souris dans chacun des 6 groupes.

Au terme de ces trois types d'études chez la souris nude, les animaux sont sacrifiés. Les tumeurs et certains organes sains (rein, foie, vessie) sont prélevés et conservés pour moitié dans du liquide de conservation (FAE : Formol 4%, Ethanol 40%, Acide Acétique 10%, H<sub>2</sub>O qsp 100%) et pour moitié sont congelés par immersion dans l'azote liquide après protection par l'iso-thiopentane.

#### 4. Résultats

##### 4.1 Spécificité des Ig2Id F1 et Ig2Id F2 pour les FGF-Rs (Figures 1A et 1B)

Les ligands naturels FGF1 et FGF2 inhibent la liaison de FGF2 iodé sur FGF-R1/2 boucles. L'image interne Ig2Id F1 de FGF1 inhibe la liaison de FGF2 iodé aux cellules CHO transfectées par FGF-R1/2 boucles alors que l'image interne Ig2IdF2 de FGF2 inhibe la liaison de FGF2 iodé aux cellules CHO transfectées soit par FGF-R1/2 boucles soit par FGF-R1/3 boucles.

Compte tenu d'une fraction spécifique estimée à 1% des immunoglobulines obtenues après purification sur protéine A, les inhibitions observées sont comparables en terme de molarité. Le plateau est obtenu avec 10 ng/ml (0,5 nM) de FGF2 et 10 µg/ml (0,6 nM) de Ig2Id F1 et Ig2Id F2.

En revanche ni FGF1 ni Ig2Id F1 n'inhibent la liaison de FGF2 iodé à FGF-R1/3 boucles. Le plateau est atteint à 3 nM de FGF2 ou Ig2Id F2.

Ig2Id F2 est donc une image interne de FGF2 et Ig2Id F1 est une image interne de FGF1.

##### 4.2 Prolifération cellulaire (Figures 2, 3, 4A et 4B).

Culture primaire VSM (Figure 2) : FGF1 et FGF2 induisent une prolifération dose-dépendante.

Ig2Id F1 et Ig2Id F2 ont des effets comparables à ceux de FGF2. Les croissances maximales sont obtenues pour 1,2 nM.

La preuve de la nature anti-idiotypique est apportée par l'observation que l'action mitogène de Ig2Id F1 (comme FGF1) est inhibée par Ig1 F1 mais pas par Ig1 F2. En revanche Ig2Id F2 est inhibé par Ig1 F2 mais pas par Ig1 F1 (Figure 3).

Lignées NBT-II et NBT-II/FGF-R1 (Figures 4A et 4B) : ni FGF2 ni Ig2Id F2 n'inhibent la croissance des cellules NBT-II puisque ces cellules n'expriment pas le récepteur FGF-R1. Bien que ces cellules expriment le récepteur FGF-R2, Ig2Id F1 n'inhibe pas la prolifération alors que FGF1 (0,05 nM) le fait.

5 A l'inverse FGF1, FGF2, Ig2Id F1 et Ig2Id F2 induisent une diminution du nombre de cellules NBT-II/FGF-R1, correspondant à 30% des valeurs des puits contrôles.

#### 4.3 Différenciation cellulaire et effet de dissociation (Figure 5).

10 La différenciation cellulaire est comparée dans le sens de l'acquisition d'un phénotype mésenchymateux sous l'effet des FGFs.

On observe que ni FGF2, ni Ig2Id F2 n'induisent la différenciation des cellules NBT-II puisqu'elles n'expriment pas le récepteur FGF-R1.

Ig2Id F1 et FGF1 induisent la dissociation des cellules NBTII.

15 A l'inverse, FGF1, FGF2, Ig2Id F1 et Ig2Id F2 induisent une dissociation des cellules NBT-II/FGFR1.

#### 4.4 Angiogenèse cornéenne (Figure 6).

20 Dans le modèle d'angiogenèse cornéenne, les immunoglobulines contrôles non immunes entraînent de manière inconstante (15% des cas) une angiogenèse mineure à l'origine d'un score moyen de 0,4 à J15, comparable à celui obtenu en saturant les lenticules avec une protéine porteuse (Sérum albumine bovine).

10 pm/ implant de FGF1 et FGF2 induisent une angiogenèse significative (scores de 2,35 et 2,05 respectivement).

25 Ig2Id F1 et Ig2Id F2 à la dose de 4 pm/implant entraînent une angiogenèse (scores de 1,3 et 1,85 respectivement à J15) significativement supérieure à celle obtenue avec les immunoglobulines contrôles ( $p < 0,05$ ).

La cinétique d'apparition des néo-vaisseaux apparaît différente de celle obtenue avec le ligand naturel.

30 A J7, le FGF2 atteint le seuil de significativité statistique avec 80% de l'effet maximal, alors que les effets induits par Ig2Id F1 et Ig2Id F2 sont à 10% et 41% des scores maximum.

Ig2Id F1 et Ig2Id F2 induisent une angiogenèse comme les ligands FGF1 et FGF2.

#### 4.5 Croissance tumorale (Figure 8).

Ni Ig2Id F1 ni Ig2Id F2 n'affectent la croissance des xénogreffes de cellules NBT-

II.

En revanche, si la croissance des cellules NBT-II/FGF-R1 n'est pas affectée par  
5 Ig2Id F1, elle est inhibée par Ig2Id F2, ce qui reproduit l'effet inhibiteur de la  
prolifération observé in vitro après l'inoculation de FGF2 ou de Ig2Id F2.

*REVENDICATIONS*

1. Utilisation d'anticorps anti-idiotypiques du facteur de croissance fibroblastique 1 et/ou d'anticorps anti-idiotypiques du facteur de croissance fibroblastique 2, pour la préparation d'un médicament destiné au traitement de pathologies impliquant des cellules endothéliales engagées dans un processus d'angiogénèse, soit pour inhiber l'angiogénèse, soit pour favoriser l'angiogénèse, sans affecter les cellules endothéliales quiescentes, ou pour la préparation d'un produit de diagnostic de pathologies impliquant des cellules endothéliales engagées dans un processus d'angiogénèse.
2. Utilisation d'anticorps anti-idiotypiques du facteur de croissance fibroblastique 1 et/ou d'anticorps anti-idiotypiques du facteur de croissance fibroblastique 2 selon la revendication 1, pour la préparation d'un médicament destiné au traitement de pathologies impliquant les cellules endothéliales angiogéniques, par stimulation sélective respective du récepteur FGFR2b et FGF-R1.
3. Utilisation d'anticorps anti-idiotypiques du facteur de croissance fibroblastique 1 et/ou d'anticorps anti-idiotypiques du facteur de croissance fibroblastique 2 selon l'une des revendications 1 ou 2, pour la préparation d'un médicament destiné au traitement de pathologies impliquant des cellules endothéliales engagées dans un processus d'angiogénèse, pour inhiber l'angiogénèse, sans affecter les cellules endothéliales quiescentes, lequel anticorps anti-idiotypique est couplé à une toxine dont la fonction est de bloquer la traduction des protéines, ladite toxine étant notamment choisie parmi la saporine, la ricine ou bien un élément radioactif tel que l'iode 125 ou 131, ou lequel anticorps anti-idiotypique est sous forme de fragment Fab.
4. Utilisation d'anticorps anti-idiotypiques du facteur de croissance fibroblastique 1 et/ou d'anticorps anti-idiotypiques du facteur de croissance fibroblastique 2 selon l'une des revendications 1 ou 2, pour la préparation d'un médicament destiné au traitement de pathologies impliquant des cellules endothéliales engagées dans un processus d'angiogénèse pour favoriser l'angiogénèse, sans affecter les cellules endothéliales quiescentes.



5. Utilisation d'anticorps anti-idiotypiques du facteur de croissance fibroblastique 1 ou d'anticorps anti-idiotypiques du facteur de croissance fibroblastique 2 selon l'une quelconque des revendications 1, 2 ou 4, pour la préparation d'un médicament destiné à :

- favoriser l'angiogénèse physiologique pour augmenter la vitesse de la formation des vaisseaux sanguins au cours de la cicatrisation, de la maturation du corps jaune de l'ovaire, et/ou

- favoriser l'angiogénèse au cours de pathologies obstructives des vaisseaux afin de repêrifier des territoires ischémiés lors de thrombose vasculaire, comme notamment dans l'artérite des membres inférieurs et l'infarctus du myocarde, et/ou

- stimuler sélectivement l'activité des récepteurs du FGF1 et/ou du FGF2 dans des pathologies où lesdits récepteurs sont fonctionnellement déficients, et/ou

- inhiber sélectivement l'activité des récepteurs du FGF1 et/ou du FGF2 à l'aide de fragments Fab ou d'anticorps anti-idiotypiques bloquants, et/ou

- retarder ou arrêter le processus de dégénérescence des photorécepteurs de la neuroretine observé au cours des rétinites pigmentaires génétiques ou acquises lors des surdosages de médicaments inhibant la phosphodiesterase dépendant du GMP-cyclique, et/ou

- stimuler la phagocytose des segments externes des bâtonnets par les cellules épithéliales pigmentées de la rétine comme traitement de certaines rétinopathies pigmentaires et des formes sèches de la dégénérescence maculaire liée à l'âge.

6. Utilisation d'anticorps anti-idiotypiques du facteur de croissance fibroblastique 1 et/ou d'anticorps anti-idiotypiques du facteur de croissance fibroblastique 2 selon l'une quelconque des revendications 1 à 3, associés à une toxine ou de fragment Fab d'anticorps anti-idiotypique, pour la préparation d'un médicament destiné au traitement de pathologies nécessitant l'inhibition de l'angiogénèse telles que cancer, rétinopathies diabétiques et le rejet de greffes de cornée.

7. Anticorps anti-idiotypique, notamment monoclonal, et notamment humanisé, du facteur de croissance fibroblastique 1, caractérisé en ce qu'il est respectivement un ligand du récepteur humain FGFR2b.

8. Anticorps anti-idiotypique, notamment monoclonal, et notamment humanisé, du facteur de croissance fibroblastique 2, caractérisé en ce qu'il est respectivement un ligand du récepteur humain FGF-R1.

9. Anticorps anti-idiotypique, notamment monoclonal, et notamment humanisé, du facteur de croissance fibroblastique 1 selon la revendication 7, caractérisé en ce qu'il présente les propriétés suivantes :

- il est spécifique vis-à-vis du récepteur FGF-R2b,
- il est circulant,
- il présente une durée de demi-vie d'environ 23 jours, notamment d'environ 21 jours, et en particulier de 22,5 jours,
- il induit la phosphorylation sur une tyrosine d'une protéine de 140 kDa,
- il induit la prolifération des cellules endothéliales vasculaires,
- il stimule l'angiogénèse,
- il ne provoque pas d'hypotension artérielle.

10. Anticorps anti-idiotypiques du facteur de croissance fibroblastique 2, notamment monoclonal, et notamment humanisé selon la revendication 8, caractérisé en ce qu'il présente les propriétés suivantes :

- il est spécifique vis-à-vis du récepteur FGF-R1,
- il est circulant,
- il présente une durée de demi-vie d'environ 23 jours, notamment d'environ 21 jours, et en particulier de 22,5 jours,
- il induit la phosphorylation sur une tyrosine d'une protéine de 140 kDa,
- il induit la prolifération des cellules endothéliales vasculaires,
- il stimule l'angiogénèse,
- il ne provoque pas d'hypotension artérielle.

11. Fragment Fab d'un anticorps anti-idiotypique selon l'une quelconque des revendications 7 à 10.

12. Complexe entre un anticorps anti-idiotypique selon l'une quelconque des revendications 7 à 10 et une toxine, en particulier choisie parmi la saporine, la ricine, ou bien un élément radioactif tel que l'iode 125 ou 131, ou le strontium.

13. Procédé de préparation d'un anticorps anti-idiotypique du facteur de croissance fibroblastique 1 et/ou d'un anticorps anti-idiotypique du facteur de croissance fibroblastique 2 selon l'une quelconque des revendications 7 à 10, caractérisé en ce que:

a) on injecte le facteur de croissance fibroblastique 1 (FGF-1) et/ou 2 (FGF-2) purifié chez un animal, notamment un lapin,

b) on prélève le sang pour récupérer les immunoglobulines Ig purifiées contenant des anticorps anti-FGF-1 (Ig1 F1) et/ou anti-FGF-2 (Ig1 F2) spécifiques, par exemple par chromatographie d'affinité pour la protéine A puis, on purifie éventuellement les Ig1 F1 et/ou Ig1 F2 spécifiques à partir des Ig purifiées, par exemple par chromatographie d'affinité pour le FGF-1 et/ou FGF-2,

c) on injecte les susdites Ig purifiées ou les susdites Ig1 F1 et/ou Ig1 F2 spécifiques et purifiées chez l'animal de la même espèce que celui utilisé lors de l'injection de FGF-1 et/ou FGF-2, notamment dans les ganglions poplités de lapin de même allotype que celui qui a produit Ig1 F1 et/ou Ig2 F2, lors de l'injection de FGF-1 et/ou FGF-2,

d) on prélève le sang pour récupérer les Ig totales, par exemple par la protéine A, puis pour soumettre les Ig totales à deux immunoabsorptions :

- une immunoabsorption sur une colonne d'affinité préparée avec les Ig préimmunes du lapin (Ig PI) qui a servi à faire les Ig1 F1 et/ou Ig1 F2, pour éliminer les anticorps anti-allotypes ou isotypes,

- une immunoabsorption sur une colonne d'affinité préparée avec des Ig1 F1 et/ou des Ig1 F2, pour purifier les anticorps anti-idiotypiques (Ig2Id F1 ou Ig2Id F2).

14. Procédé de préparation d'un anticorps monoclonal anti-idiotypique de FGF1 et/ou d'un anticorps monoclonal anti-idiotypique de FGF-2 selon l'une quelconque des revendications 7 à 10, caractérisé en ce que :

a) on injecte FGF-1 et/ou FGF-2 à un animal, et notamment à une souris,

b) on récupère les splénocytes de l'animal synthétisant des Ig1 F1 et/ou Ig1 F2,

c) on fusionne les susdits splénocytes avec des cellules de myélome,

d) on sélectionne les hybridomes obtenus à l'issue de l'étape c) précédente en ce qu'ils synthétisent des immunoglobulines dirigées contre FGF-1 et/ou FGF-2,

e) on injecte les Ig1 F1 et/ou Ig1 F2 ainsi sélectionnés à l'issue de l'étape d) à un animal, et notamment à une souris, de même allotype que celui ayant produit Ig1 F1 et/ou Ig1 F2,

- f) on récupère les splénocytes synthétisant des Ig2Id F1 et/ou Ig2Id F2,
- g) on fusionne les cellules de la rate (splénocytes) avec des cellules de myélome,
- h) on sélectionne les hybridomes obtenus à l'issue de l'étape g) précédente en ce qu'ils synthétisent des Ig2Id F1 dirigés contre Ig1 F1 et/ou des Ig2Id F2 dirigés contre Ig1 F2,
- i) on récupère lesdits Ig2Id F1 et/ou des Ig2Id F2.

15. Compositions pharmaceutiques caractérisées en ce qu'elles comprennent à titre de substance active au moins un anticorps anti-idiotypique selon l'une quelconque des revendications 7 à 10, ou au moins le fragment Fab selon la revendication 11 ou au moins le complexe selon la revendication 12, en association avec un véhicule pharmaceutiquement acceptable.

Figure 1A

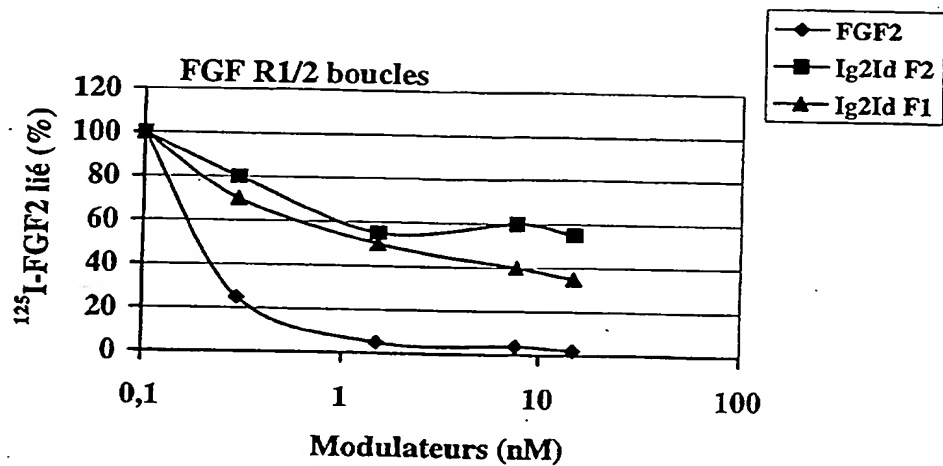


Figure 1B

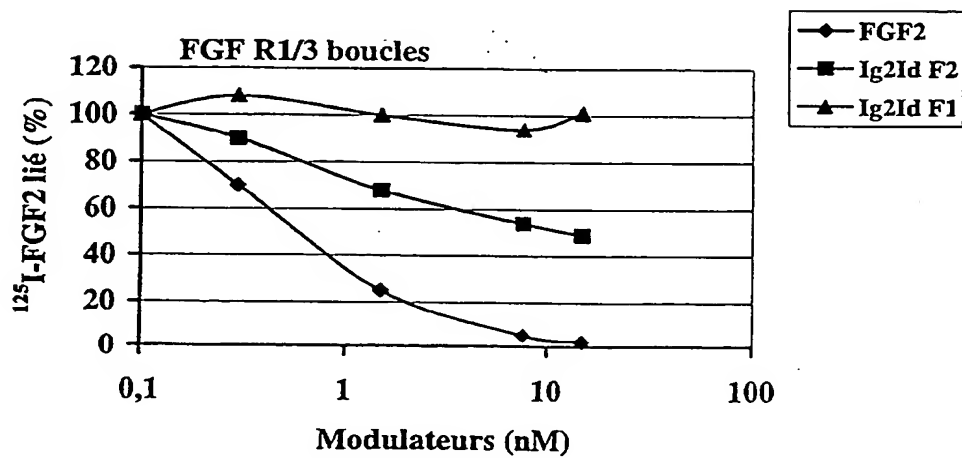


Figure 2

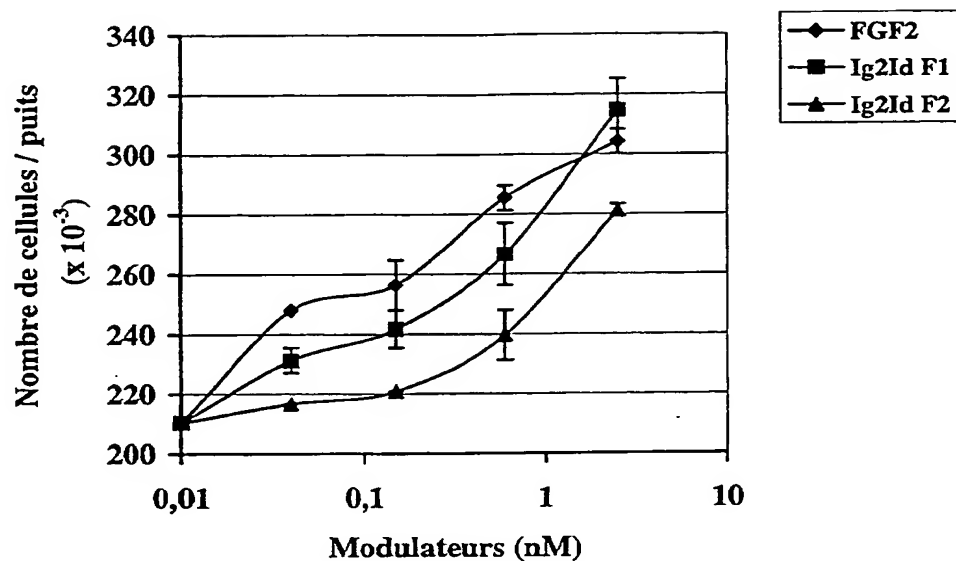
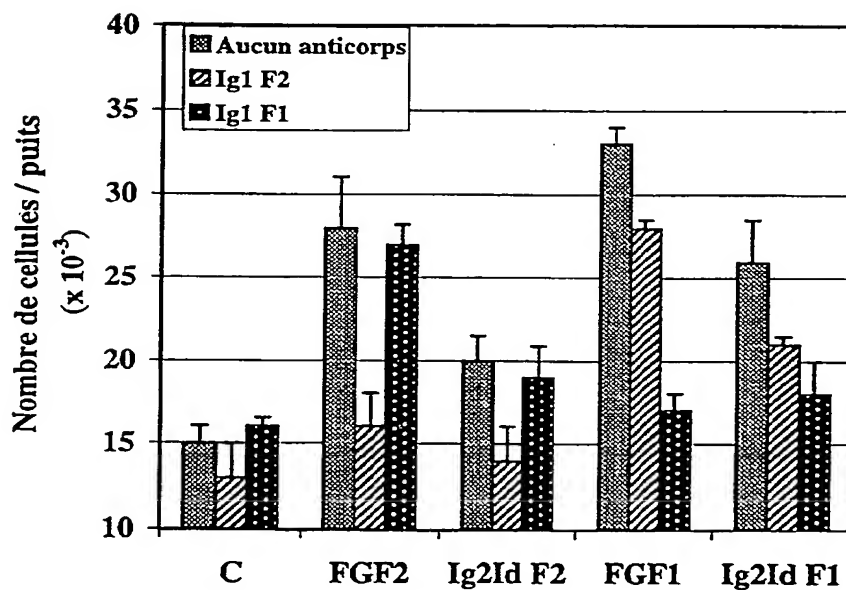


Figure 3



3/6

Figure 4A

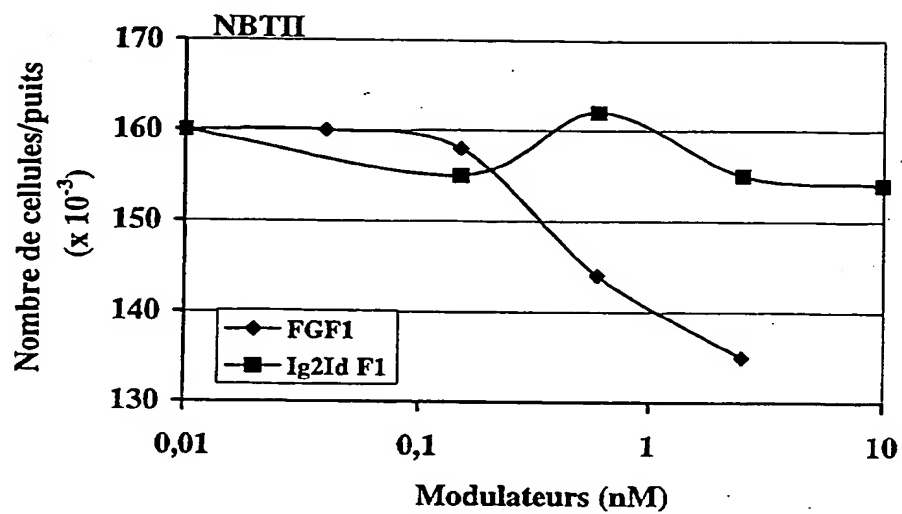
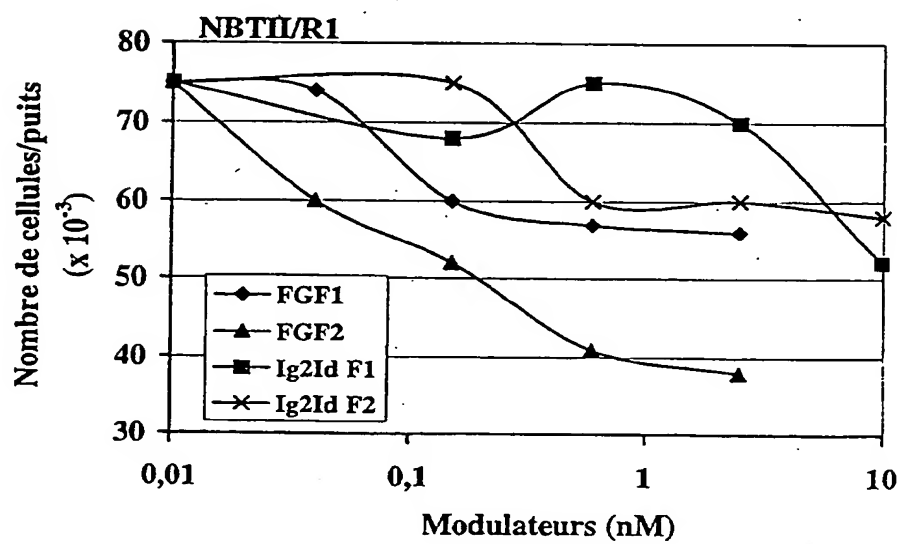


Figure 4B



4/6

Figure 5

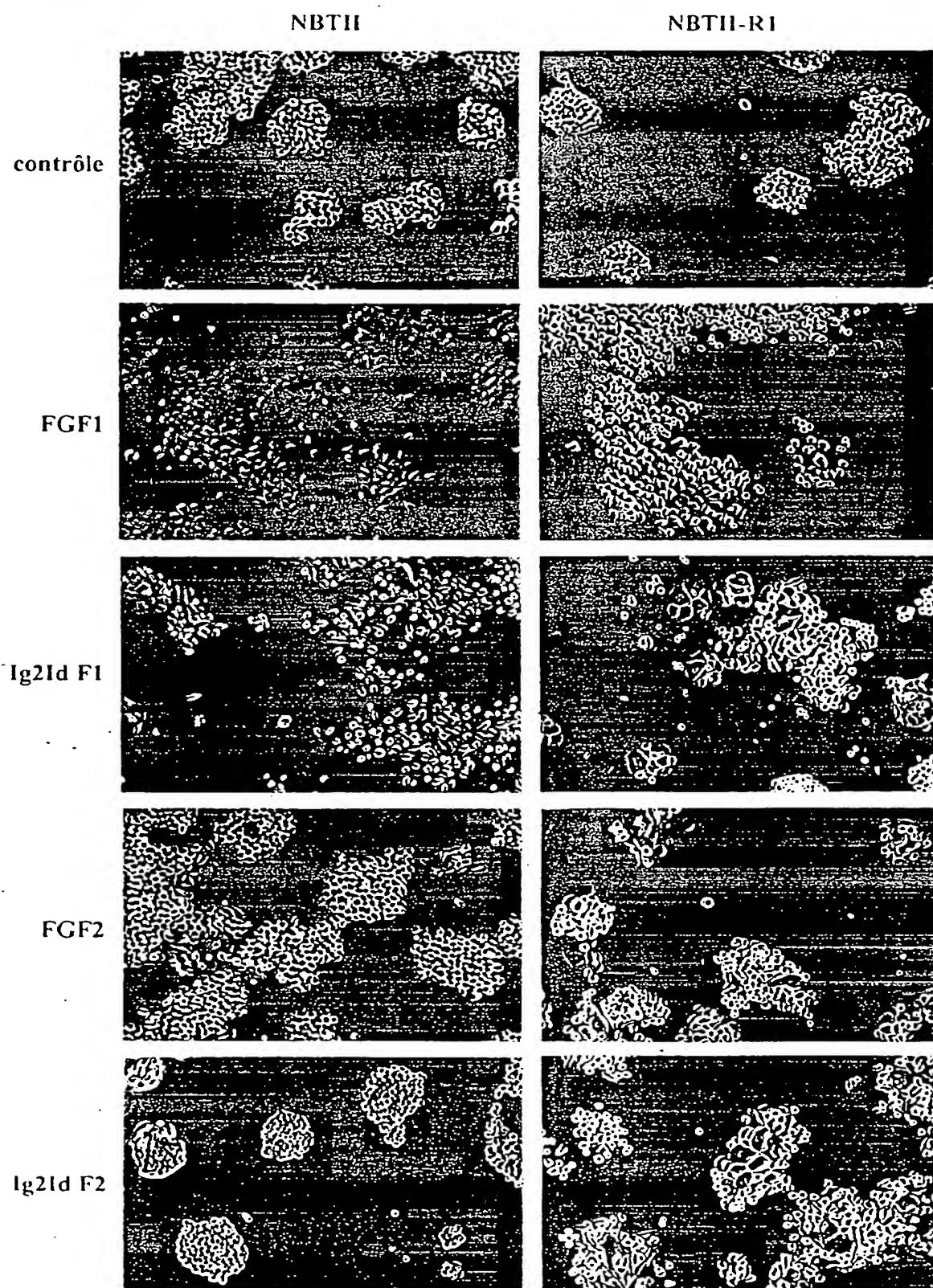
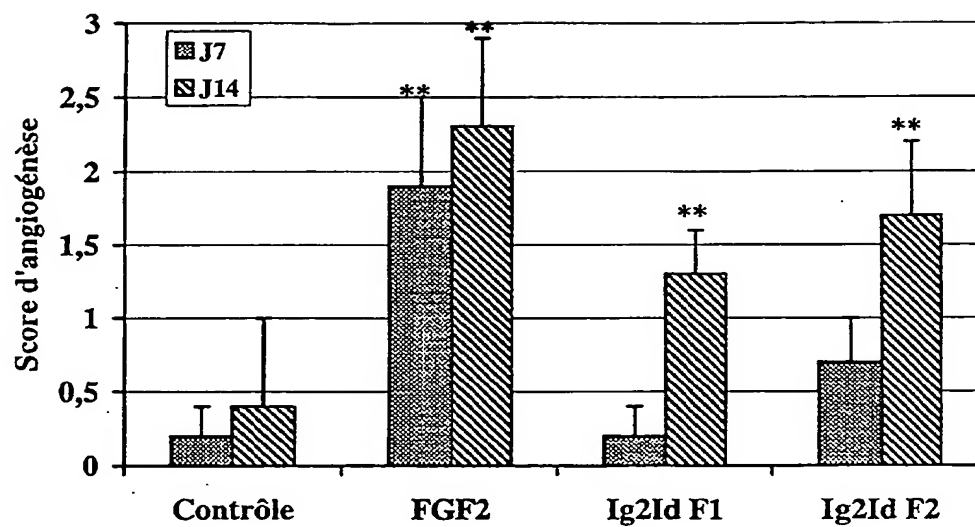




Figure 6



6/6

Figure 7A

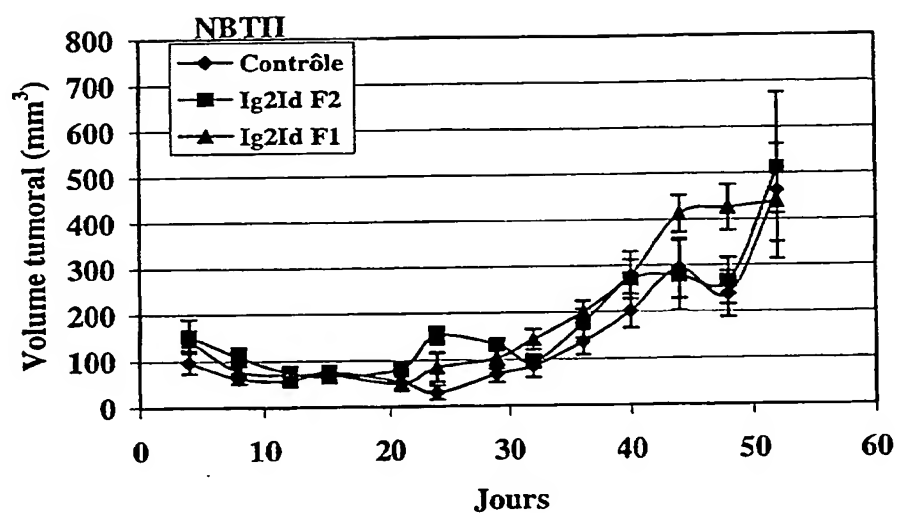
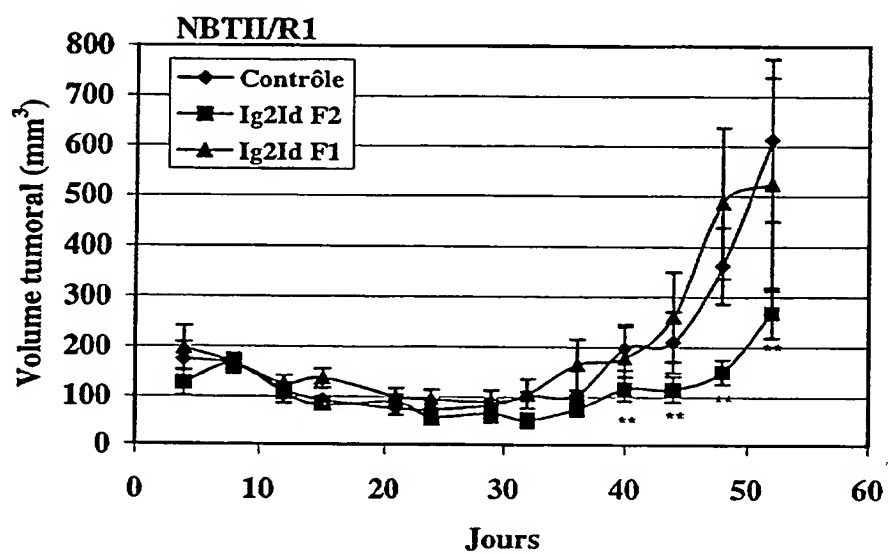


Figure 7B



INSTITUT NATIONAL  
de la  
PROPRIÉTÉ INDUSTRIELLE

RAPPORT DE RECHERCHE  
PRELIMINAIRE

établi sur la base des dernières revendications  
déposées avant le commencement de la recherche

N° d'enregistrement  
national

FA 579177  
FR 9908779

DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		Revendications concernées de la demande examinée
Catégorie	Citation du document avec indication, en cas de besoin, des parties pertinentes	
X	ORTEGA N ET AL: "Modulation de la progression tumorale par des anticorps anti-idiotypiques de facteurs angiogéniques." COMPTES RENDUS DE L'ACADÉMIE DES SCIENCES. SÉRIE III, SCIENCES DE LA VIE, vol. 319, no. 5, mai 1996 (1996-05), pages 411-5, XP000601935 * page 412, colonne de gauche, ligne 60 - ligne 64 *	1,2,4-6, 8,10, 13-15
Y	---	3,7,11, 12
Y	FR 2 742 662 A (CNRS) 27 juin 1997 (1997-06-27) * revendications 1-15 *	3,11,12
Y	WO 98 21237 A (PRAECIS PHARMACEUTICALS INCORPORATED) 22 mai 1998 (1998-05-22) * page 3, ligne 2 - ligne 7 *	7
A	DIKOV M ET AL: "A functional fibroblast growth factor-1 immunoglobulin fusion protein." JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, vol. 273, no. 25, 19 juin 1998 (1998-06-19), pages 15811-7, XP002131796 * page 15812, colonne de droite, ligne 65 - page 15814, colonne de droite, ligne 22 * * page 15816, colonne de droite, ligne 10 * ---	1-15
		DOMAINES TECHNIQUES RECHERCHES (Int.CL.7)
		C07K A61K A61P
		-/--
Date d'achèvement de la recherche		Examineur
29 février 2000		Le Flao, K
CATEGORIE DES DOCUMENTS CITES		
X : particulièrement pertinent à lui seul Y : particulièrement pertinent en combinaison avec un autre document de la même catégorie A : pertinent à l'encontre d'au moins une revendication ou arrière-plan technologique général O : divulgation non-écrite P : document intercalaire		
T : théorie ou principe à la base de l'invention E : document de brevet bénéficiant d'une date antérieure à la date de dépôt et qui n'a été publié qu'à cette date de dépôt ou qu'à une date postérieure. D : cité dans la demande L : cité pour d'autres raisons & : membre de la même famille, document correspondant		

1

EPO FORM 1503 03.82 (P04C13)

REPUBLIQUE FRANÇAISE

2796073

INSTITUT NATIONAL  
de la  
PROPRIETE INDUSTRIELLE

**RAPPORT DE RECHERCHE  
PRELIMINAIRE**

établi sur la base des dernières revendications  
déposées avant le commencement de la recherche

N° d'enregistrement  
national

FA 579177  
FR 9908779

DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		Revendications concernées de la demande examinée
Catégorie	Citation du document avec indication, en cas de besoin, des parties pertinentes	
A	PLOUET J ET AL: "VEGF dependent tumoral progression: stimulation by anti VEGF idiotypic antibodies." JOURNAL OF CELLULAR BIOCHEMISTRY. SUPPLEMENT 18A,1994, page 328 XP000602723 abrégé EZ3111	1-15
T	WO 99 45018 A (IMCLONE SYSTEMS INCORPORATED) 10 septembre 1999 (1999-09-10) * page 1 - page 3; revendications 1-56 *	1-15
		DOMAINES TECHNIQUES RECHERCHES (Int.CL.7)
Date d'achèvement de la recherche		Examineur
29 février 2000		Le Flao, K
<p><b>CATEGORIE DES DOCUMENTS CITES</b></p> <p>X : particulièrement pertinent à lui seul Y : particulièrement pertinent en combinaison avec un autre document de la même catégorie A : pertinent à l'encontre d'au moins une revendication ou arrière-plan technologique général O : divulgation non-écrite P : document intercalaire</p> <p>T : théorie ou principe à la base de l'invention E : document de brevet bénéficiant d'une date antérieure à la date de dépôt et qui n'a été publié qu'à cette date de dépôt ou qu'à une date postérieure. D : cité dans la demande L : cité pour d'autres raisons &amp; : membre de la même famille, document correspondant</p>		

1  
EPO FORM 1503 03.82 (P04C13)

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning  
Operations and is not part of the Official Record**

## **BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ BLACK BORDERS
- ☐ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- ☐ FADED TEXT OR DRAWING
- ☒ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- ☐ SKEWED/SLANTED IMAGES
- ☐ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- ☐ GRAY SCALE DOCUMENTS
- ☐ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- ☐ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- ☐ OTHER: \_\_\_\_\_

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.**

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**